

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-075547

(43)Date of publication of application : 20.03.1995

(51)Int.Cl.

C12M 1/00
C08F120/28
C12M 3/00
C12N 5/06

(21)Application number : 05-246132

(71)Applicant : BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 07.09.1993

(72)Inventor : WATANABE YOSHIKI

(54) CULTURE SUBSTRATE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a culture substrate capable of controlling the linkage of synapses in an arbitrary form and culturing the neurocytes and suitable for the culture of primary neurocytes by coating polyhydroxyethyl methacrylate on a specific substrate and subsequently removing metal oxide regions together with the coated layer.

CONSTITUTION: Polyhydroxyethyl methacrylate is coated on a substrate in which fine regions to be used as cell-adhering regions have been formed from the thin layers of a metal oxide such as aluminum oxide or indium oxide, and the metal oxide regions are subsequently removed together with the coating layer to obtain the objective culture substrate in which cell-non-adhesive fine regions have been formed on the substrate with the polyhydroxyethyl methacrylate. Neurocytes cultured together with glia cells are preferably cultured in the culture medium in a stably controlled form.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.01.1994

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 21.01.1997

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3126269

[Date of registration] 02.11.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 09-02667

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 19.02.1997

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-75547

(43)公開日 平成7年(1995)3月20日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/00	Z			
C 0 8 F 120/28	MML			
C 1 2 M 3/00	A			
C 1 2 N 5/06		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	E
			審査請求 有	請求項の数4 F D (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平5-246132

(22)出願日 平成5年(1993)9月7日

(71)出願人 591082269

株式会社バイオマテリアル研究所
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

(72)発明者 渡辺 芳明

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(74)代理人 弁理士 須藤 政彦

(54)【発明の名称】 培養基質

(57)【要約】

【目的】 神経系細胞の培養に好適な培養基質を提供する。

【構成】 ポリハイドロキシエチルメタクリレートが基質上に細胞非接着性の微少領域を形成していることを特徴とする培養基質。金属酸化物の薄層が細胞の接着領域となる微少領域を形成している基質にポリハイドロキシエチルメタクリレートをコートし、当該金属酸化物領域をそのコート層とともに除去することからなる当該培養基質の製造方法。当該培養基質を用いることを特徴とするグリア細胞と共培養する神経細胞の形態制御安定培養方法。

【効果】 特に初代神経細胞の培養を好適に行うことを可能とするものであり、また、従来の培養にみられるような情報伝達を行う機能を持つ神経細胞のランダムな結合状態の培養ではなく、神経細胞のシナプスによる結合を任意の形態に制御してその培養を安定に行うことを可能とする。

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ポリハイドロキシエチルメタクリレートが基質上に細胞非接着性の微少領域を形成していることを特徴とする培養基質。

【請求項 2】 金属酸化物の薄層が細胞の接着領域となる微少領域を形成している基質にポリハイドロキシエチルメタクリレートをコートし、当該金属酸化物領域をそのコート層とともに除去することを特徴とする請求項 1 記載の培養基質の製造方法。

【請求項 3】 請求項 1 記載の培養基質を用いることを特徴とするグリア細胞と共培養する神経細胞の形態制御安定培養方法。

【請求項 4】 請求項 2 記載の製造方法により得られる培養基質を用いることを特徴とするグリア細胞と共培養する神経細胞の形態制御安定培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生体外において細胞を培養する場合に使用する新規培養基質に関するものである。一般に、細胞は生体内では様々な大きさの特異な形態を持つ集合体を形成している。また、この集合体は相互に情報伝達を行っているが、このような形態、機能、情報伝達的作用を明らかにすることが病因の解明、新薬の創製、治療法の開発につながることから、これらに関する活発な研究がなされている。特に脳神経系は、最近、分子生物学の手法を取り入れた研究が電気生理学の手法と結び付き多くの成果が得られている。本発明は、このような研究及び開発に必須な手法である細胞培養法に用いる新規培養基質に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、生体外における細胞培養法としては、細胞を凝集体として培養する方法、均一な平面上での単層培養法、浮遊状態で培養する浮遊培養法が代表的なものとして使用されている。これらは、培養基質として、ガラス、プラスチックのような材料からなる平面基質をそのまま用いるか、あるいはコラーゲン、フィブロネクチン、ポリリジンなどの細胞接着性タンパク質をコートしたものを使用するものである。また、ゲル状のコラーゲン、細胞外マトリックスを用いる方法、単層培養した細胞を培養基質とする方法も細胞の種類によっては汎用されている方法である。培養基質としては、更に膜をファイバー状、カップ状にしたものがよく用いられる。しかしながら、従来のものは、いずれの方法も細胞の任意の形態制御は不可能であり、例えば、均一平面上での培養は同種の細胞が無制御に増えてくるため細胞の形態を制御することは困難である。また、細胞どうしがランダムな接触を行うため特定細胞の情報伝達機能を測定することも難しいと云った各種の問題点がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、神経細胞の

2

培養方法のなかで安定性の高い方法としてグリア細胞を培養基質として使用する手法がある (M. A. Dichter, Brain. Res., 149 巻, 279 ページ, 1978 年、及び R. I. Freshney, "Culture of Animal Cells.", 1987 年、他)。これは培養基質上でグリア細胞を最初に培養しておき、次に、神経細胞をこのグリア細胞の上で培養するいわゆる共培養法によるものである。当該培養法によると、グリア細胞の産生する神経栄養因子などの働きにより培養が安定化すると云う効果が得られる。

【0004】 しかしながら、単なる均一平面上での培養では神経細胞のシナプスによる結合はランダムに起こり制御された神経ネットワークを形成することはできない。すなわち、最初に培養しておくグリア細胞を一定の培養状態に制御しなければ、共培養する神経細胞を一定の形態制御された結合体として形成することはできないことから、神経細胞の形態制御を簡便に行うことが可能な新しい培養方法を開発することが強く要請されている状況にあった。

【0005】 そこで、本発明者は、このような事情に鑑みて、神経細胞に対して毒性や阻害作用を示さず、グリア細胞の培養状態を制御し得る基質を開発することを目指として種々検討した結果、細胞接着性を示さないポリマーにより基質上に細胞非接着性の微少領域を形成する方法が大きな効果を示すことを見出し、更に検討を重ねて、本発明を完成するに至ったものである。

【0006】 すなわち、本発明の目的とするところは、生体外において神経細胞の培養形態を制御し安定に培養が行えるグリア細胞と共培養するための新規培養基質を提供することにある。

【0007】 また、本発明の目的とするところは、生体外において神経細胞を安定に培養できるグリア細胞と共培養するための新規培養基質の製造方法を提供することにある。

【0008】 また、本発明の目的とするところは、このような培養基質を用いてグリア細胞と共培養して神経細胞の培養形態を制御し、安定して培養できる方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】 このような目的を達成するための本発明は、次の (1) ~ (4) の技術的手段から構成されるものである。

(1) ポリハイドロキシエチルメタクリレートが基質上に細胞非接着性の微少領域を形成していることを特徴とする培養基質。

【0010】 (2) 金属酸化物の薄層が細胞の接着領域となる微少領域を形成している基質にポリハイドロキシエチルメタクリレートをコートし、当該金属酸化物領域をそのコート層とともに除去することを特徴とする前記

50

(1) 記載の培養基質の製造方法。

【0011】(3) 前記(1) 記載の培養基質を用いることを特徴とするグリア細胞と共培養する神経細胞の形態制御安定培養方法。

【0012】(4) 前記(2) 記載の製造方法により得られる培養基質を用いることを特徴とするグリア細胞と共培養する神経細胞の形態制御安定培養方法。

【0013】次に、本発明について更に詳細に説明する。本発明において、基質とは、本発明の培養基質のベースとして使用されるものを意味するものであり、例えば、培養した細胞に毒性を示さないガラスや、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン等のプラスチック、銀、金等の金属、インジウムスズ酸化物等の金属酸化物、セラミック等を意味するが、これらに限らず、これらと同効の物質であれば同様に使用することができる。

【0014】これらの基質を用いて調製した本発明の培養基質の形態は、特に限定されないが、例えば、フィルム、シャーレ、プレート、フラスコ、ボトル、スライドグラス、カバーグラス、マイクロキャリア、ホローファイバー、ファイバー等の適宜の形態に形成したものが好適なものとして例示される。

【0015】従来、ポリハイドロキシエチルメタクリレート一種のポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)は細胞非接着性ポリマーとして知られている(Nature, 273巻, 345ページ, 1978年)。本発明は、当該ポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)等のポリハイドロキシエチルメタクリレートを使用することを必須の構成とするものであるが、これを基質上に単にコートするために使用するのではなく、このポリマーを基質上に細胞非接着性の微少領域として形成することにより、グリア細胞の培養状態を制御して、形態制御した神経細胞の安定した培養を可能とするものとして使用するものである。

【0016】ポリハイドロキシエチルメタクリレートの細胞非接着性の微少領域の形成法としては様々な方法が可能であるが、例えば、次の方法が好適なものとして例示される。まず、細胞の接着領域となる金属酸化物の微少領域を形成する。この部分は最終的にはポリハイドロキシエチルメタクリレートが存在しない細胞接着性の微少領域となる。また、金属酸化物は特に限定されないが酸化アルミニウム、酸化インジウム、酸化スズ、インジウムスズ酸化物、酸化チタンなどが好適である。金属酸化物の薄層の形成は、スパッタリング法等適宜の方法により行えばよく特に限定されるものではない。この場合、基質として、例えば、ポリエーテルスルホンの0.1mm厚のフィルム(住友ベークライト社製)を使用し、これにインジウムスズ酸化物層をスパッタリング法(装置:日立工機社製)で形成する方法等が好適なものとして例示される。

【0017】このフィルム等の基質上に集積回路の製造に汎用されているフォトリソで細胞の接着領域となる微少領域パターンを形成する。当該微少領域の形状は特に限定されるものではないが、細胞の接着領域として最小0.01~0.02mmは必要である。他の大きさは検討項目、実験対象により適切なものを選ばよい。また、フォトリソは特に限定されるものではないが微少領域の大きさにより高解像度のものを使う必要がある場合もある。フォトリソでパターンを形成後、0.1~10規定の酸で洗浄してフォトリソ非被覆部の金属酸化物を除いてから、アルコールで洗浄してフォトリソを除く。

【0018】上記のようにして細胞の接着領域となる金属酸化物の微少領域を形成してからポリハイドロキシエチルメタクリレートを基質上にコートする。この場合、ポリハイドロキシエチルメタクリレートとしては、0.1~12%のポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)等のアルコール溶液が好適なものとして使用されるが、これに限らず、これと同効のものであれば同様に使用することができる。また、コートを均一化するためにコートする際に基質を回転させることが好ましい。最後に1~10規定の酸で基質を超音波洗浄して金属酸化物領域をそのコート層とともに除去することにより、本発明の培養基質は製造される。

【0019】グリア細胞は適宜のものでよく、株細胞、初代細胞等に限定されるものではないが、初代細胞を用いたほうが安定性が良く、好適である。培養する神経細胞が、中枢神経であれば中枢神経組織を、末梢神経であれば末梢神経組織を用いて定法により細胞を採取、調製し、培養すればよい。細胞の調製法は特に限定されないが、例えば、0.1~5%のトリプシン、コラゲナーゼ等の酵素を用いて組織を分散して細胞を採取し、調製する方法が好適なものとして例示される。採取した細胞は、例えば、神経細胞の培養に用いるDME/F-12、DME、EME、F-12・L-15(GIBCO BRL社製)等の培地に牛胎児血清10%を加えたものを用いて、約37℃の炭酸ガスインキュベーター中で培養すればよい。

【0020】こうして培養したグリア細胞を次に本発明の培養基質で培養し、更にこのグリア細胞の上で神経細胞を培養する。ここでいう神経細胞とは、株化されたものではなく初代中枢神経細胞、初代末梢神経細胞等を意味する。これらの神経細胞を本発明の基質、方法で培養するにはその手段は特に限定されるものではなく、上記した培養液、培養法を用いて常法に準じて実施すればよい。以上の如く、本発明は、基質上にポリハイドロキシエチルメタクリレートによる細胞非接着性の微少領域を形成した培養基質を使用し、グリア細胞と共培養して神経細胞の形態制御を安定に行うことを可能にするものであり、本発明の培養基質を使用することによってはじめて

このような結果が得られるものである。

【0021】

【実施例】次に、実施例及び比較例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(1) 培養基質の製造

ポリエーテルスルホンを基質として使用し、これにインジウムスズ酸化物の薄層を被覆した0.1mm厚のフィルム20cm角（住友ベークライト社製、FST-1300）に、ポジ型フォトレジスト（東京応化工業社製、OFPR-5000）をスピナーコーティング法により膜厚1.5μmにコートした。露光装置（ニコン社製、NSR-15053A）を用いて、20μm幅、長さ1000μmの矩形を平行に50本、形成した。露光時間は150ms、現像液（東京応化工業社製、NWD-W）で現像後、純水で洗浄し、80℃で20分乾燥した。次いで、1規定塩酸、純水、エチルアルコール、純水の順で洗浄してフォトレジスト非被覆部の金属酸化物を除いてからフォトレジストを除いた後、スピナーコーティング法で12%、6%、4%、2%のポリ（2-ハイドロキシエチルメタクリレート）のエチルアルコール溶液をコートしたものをそれぞれ調製した。2規定塩酸で3分超音波洗浄して金属酸化物領域をそのコート層とともに除去し、純水洗浄を行い本発明の培養基質を製造した。

【0022】(2) グリア細胞の培養

ラット新生児の脳からSean Murphyの方法（Methods in Neuroscience, 2巻, 33ページ, 1990年）によりグリア細胞を取り出し牛胎児血清10%を添加したDME/F-12液（GIBCOBRL社製）を用いて2週間培養した。なお、培養はすべて37℃で、炭酸ガスインキュベーター中で行った。直径35mmのガラスシャーレ内に上記したフィルムを直径34mmに切りとり、これをその中におき、培養したグリア細胞を10万/mlの濃度で2ml加え3日間培養した。

【0023】(3) 神経細胞の培養

*

* 神経細胞は、大脳辺縁系海馬領域よりJ. M. Bekkerらの方法（Nature, 341巻, 230-233ページ, 1989年）により取り出し、5万/mlの濃度で上記したあらかじめグリア細胞を培養してある本発明の培養基質へ加え、7日間培養した。

【0024】比較例 1

比較例として、ガラスシャーレ内にポリエーテルスルホンのフィルムを入れて培養する他は上記実施例1の場合と同様にして神経細胞の培養を行った。

【0025】比較テスト

上記実施例1及び比較例1により得られた神経細胞について、その形態制御が安定に行われているかどうかを比較テストしたところ、比較例1では神経細胞がランダム状態で培養されており細胞同士の結合も不規則であり神経細胞の結合によるシナプスはランダムなものであったが、本発明により調製したサンプルではいずれも安定した培養状態が観察されるとともに直線状の神経細胞の結合（シナプス形成）が認められ、良好に培養形態が制御されていることが観察され、本発明の培養基質は優れた特性を有するものであることが確認された。尚、他の基質、及び金属酸化物を用いて製造した培養基質を用いて同様に比較したところ、同様の効果がえられることが分った。

【0026】

【発明の効果】以上詳述したとおり、本発明は細胞非接着性ポリマーであるポリ（2-ハイドロキシエチルメタクリレート）等のポリハイドロキシエチルメタクリレートの細胞非接着性の微少領域を形成することによる培養基質とその製造方法、及びこれを用いたグリア細胞と神経細胞の共培養方法による神経細胞の形態制御安定培養方法に係わるものであり、本発明によれば、特に初代神経細胞の培養を好適に行うことを可能とするものであり、また、従来の培養にみられるような情報伝達を行う機能を持つ神経細胞のランダムな結合状態の培養ではなく、神経細胞のシナプスによる結合を任意の形態に制御してその培養を安定に行うことを可能とするものである。